

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.18.008

miR-221 对甲状腺乳头癌生物学特性的影响*

刘春梅¹ 齐学林¹ 马亚萍¹ 杨亚峰¹ 张秀德¹ 潘娟¹ 王永席¹ 宗伟² 姜孝新^{3Δ}

(1 咸阳市中心医院内分泌科 陕西 咸阳 712000;

2 陕西省人民医院消化内科 陕西 西安 710000;3 南华大学附属第一医院 湖南 衡阳 421001)

摘要目的:探讨 miR-221 对甲状腺乳头癌生物学特性的影响。**方法:**培养人甲状腺乳头癌细胞株 BCPAP、K1、TPC-1 和正常甲状腺细胞株 Nthy-ori 3-1。将实验分为四组:A:miR-221 模拟物组;B组:miR-221 抑制物组;C:无关序列组;D:空白对照组。RT-qPCR 的方法检测 miR-221 在各个细胞中的表达以及转染后各组细胞的表达;MTT 实验检测转染后各组细胞的增殖;划痕实验检测转染后各组细胞的迁移能力;流式细胞仪检测转染后各组细胞的凋亡情况。**结果:**RT-qPCR 检测 miR-221 在三个细胞株的表达情况显示,miR-221 甲状腺乳头癌细胞株 TPC-1 的表达最高,因此选择 TPC-1 作为后续的研究;miR-221 在转染后各组细胞的表达量显示,转染 miR221 模拟物的 miR221 的表达显著高于空白对照组,转染 miR221 抑制物的 miR221 的表达显著低于空白对照组 ($P < 0.001$);MTT 实验结果显示,转染 miR-221 模拟物组细胞的增殖速度最快,转染 miR-221 抑制物组细胞的增殖速度最慢,miR-221 模拟物组和 miR-221 抑制物组细胞从第三天开始与空白对照组有显著差异 ($P < 0.01$),无关对照组与空白对照组无显著差异 ($P > 0.05$);划痕实验结果显示,转染 miR-221 模拟物组细胞的迁移数显著高于空白对照组,转染 miR-221 抑制物组细胞的迁移数显著低于空白对照组 ($P < 0.01$),无关对照组与空白对照组无显著差异 ($P > 0.05$);流式细胞仪结果显示,转染 miR-221 模拟物组细胞凋亡率显著低于空白对照组 ($P < 0.01$),转染 miR-221 抑制组细胞凋亡率显著高于空白对照组 ($P < 0.001$),转染无关对照对细胞凋亡无影响 ($P > 0.05$)。**结论:**过表达 miR-221 可促进细胞增殖、迁移,抑制细胞凋亡。抑制 miR-221 表达可降低细胞增殖、迁移,增加细胞凋亡。

关键词: miR-221;甲状腺乳头癌;增殖;迁移;凋亡**中图分类号:** R-33;R736.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2017)18-3438-05

Effects of miR-221 on the Biological Characteristics of Papillary Thyroid Carcinoma*

LIU Chun-mei¹, QI Xue-lin¹, MA Ya-ping¹, YANG Ya-feng¹,ZHANG Xiu-de¹, PAN Juan¹, WANG Yong-xi¹, ZONG We², JIANG Xiao-xin^{3Δ}

(1 Department of Endocrine, Xianyang Central Hospital, Xianyang, Shaanxi, 712000, China;

2 Department of gastroenterology, the Shaanxi Province People's Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710000, China;

3 The First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan, 421001, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effect of miR-221 on the biological characteristics of papillary thyroid carcinoma. **Methods:** We cultured human papillary thyroid carcinoma cell lines BCPAP, K1, TPC-1 and normal thyroid cell lines 3-1 Nthy-ori. Four groups were designed in this experiment, A: miR-221 mimics group; B: miR-221 inhibitor group; C: unrelated sequence group; D: blank control group. RT-qPCR method was used to detect the expression of miR-221 in individual cells and expression in transfected cells. The proliferation of cells in each group was determined by MTT assay after transfection. The cells migration ability after transfection in each group of cells was detected by scratch assay. And the flow cytometry was used to detect cells apoptosis after the transfection in each group. **Results:** The expression of miR-221 was detected by RT-qPCR in three cell lines. The expression of TPC-1 was the highest in the papillary thyroid carcinoma cell line, so the TPC-1 was selected for the follow-up study. After transfection, the expression of miR-221 in mimics group was significantly higher than that of the blank control group, while the expression of miR-221 in miR-221 inhibitor group was significantly lower than that of the blank control group ($P < 0.001$). MTT assay showed that the proliferation of cells was the fastest in miR-221 mimics group, and the slowest in miR-221 inhibitor group. The cell proliferation speed in the miR-221 mimics group and miR-221 inhibitor group had significant difference from the third day as compared to the blank control group ($P < 0.01$), but it had no significant difference between the unrelated sequence group and the blank control group. The scratch test results showed that the number of transference cells in miR-221 mimics group were significantly more than in blank control group, and that in miR-221 inhibitor group

* 基金项目:陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2014JM4141);湖南省自然科学基金项目(14JJ2092)

作者简介:刘春梅(1970-),女,主治医师,研究方向:主要从事糖尿病并发症以及甲状腺相关疾病,

电话:13909101955, E-mail: w107wiq@163.com

Δ 通讯作者:姜孝新(1971-),男,博士,副教授,主任技师,研究方向:肝癌发病机制及治疗, E-mail: jianxiaoxin168@126.com

(收稿日期:2016-11-01 接受日期:2016-11-26)

were much less than in blank control group ($P < 0.01$). No such difference were found between the unrelated control group and blank control group ($P > 0.05$). The flow cytometry results displayed that the apoptosis rate was significantly lower in miR-221 mimics groups than in blank control group, but significantly higher in miR-221 inhibition group than in blank control group ($P < 0.001$). There was no significant difference in cell apoptosis between the blank control group and unrelated sequence group. **Conclusion:** Over expression of miR-221 can promote cell proliferation and migration, and reduce cell apoptosis. Inhibition of miR-221 expression could reduce the cell proliferation and migration and increase apoptosis.

Key words: miR-221; Papillary thyroid carcinoma; Proliferation; Migration; Apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R736.1 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2017)18-3438-05

前言

甲状腺癌是一种常见的内分泌系统恶性肿瘤,依据病理特征可分为乳头状癌、未分化癌和滤泡状腺癌,其中甲状腺乳头状癌(papillary thyroid carcinoma, PTC)的发病率最高,占甲状腺癌的比例高达 85-90%,而且近些年相关部门的统计数据显示甲状腺乳头状癌的发病率呈逐年上升的趋势^[1-4]。因此,对甲状腺乳头状癌的研究已受到广大研究者的关注。

MicroRNAs(miRNAs)是一类小分子非编码的 RNA,长度一般为 20~25 个核苷酸。随着近些年生物技术的不断发展,研究者发现 miRNAs 在肝癌、胶质瘤、胃癌等肿瘤的发生发展、迁移等过程中发挥重要作用,这些肿瘤的发生均于 miRNAs 的异常表达有关^[5-8]。研究显示,miR-221 在骨肉瘤细胞中高表达,能促进细胞增殖,抑制细胞凋亡^[9,10],在甲状腺乳头状癌的癌旁组织中也高表达^[11,12],这些前人的研究结果表明 miR-221 对肿瘤的发生具有重要的作用。因此,本研究将 miR-221 模拟物和 miR-221 抑制物转染到甲状腺乳头状癌细胞 TPC-1 中,检测 miR-221 对细胞增殖、凋亡以及迁移的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人甲状腺乳头状癌细胞株 BCPAP、K1、TPC-1 和甲状腺正常细胞株 Nthy-ori 3-1 由第四军医大学细胞生物研究中心提供。PBS、胰蛋白酶、胎牛血清购自美国 Gibco;RPMI1640 培养基购自美国 Hyclone 公司;MTT 细胞增殖试剂盒购自美国 millipore 公司;细胞培养箱购自美国西盟公司;倒置荧光显微镜购自日本 Nikon,流式细胞仪购自美国 Becton Dickinson 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞的培养 从液氮罐中取出人甲状腺乳头状癌细胞株 BCPAP、K1、TPC-1 和正常甲状腺细胞株 Nthy-ori 3-1 的细胞冻存管,立即放入 37℃ 水浴锅中解冻,并轻轻摇动冷冻管使其在 1 分钟内全部融化,用 75%酒精擦拭冻存管外部,移入超净工作台。取出解冻的细胞悬液,加入含有 5 mL RPMI1640 培养基的离心管中,1000 rpm 离心 10 min。弃上清,加入细胞生长液悬浮细胞,接种于细胞培养板中,在 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后,更换培养基。观察到细胞达到 90%融合时,37℃ 预热 10% PBS、胰酶和细胞培养基,弃细胞培养皿中的培养基,10% PBS 洗两遍。加入 1 mL 0.25% 胰蛋白酶消化细胞,当观察到细胞层出现模糊不清时,加入 1 mL 含血清的培养基终止消化,1000 rpm 离心 5 min,弃胰酶与培养基混合物。PBS 洗涤细

胞两次,弃上清,加入适量的细胞生长液混匀后,接种到细胞培养板中培养细胞。

1.2.2 细胞转染 试验分为 4 组:A:miR-221 模拟物组;B 组:miR-221 抑制物组;C:无关序列组;D:空白对照组。将对数生长期的甲状腺乳头状癌细胞株 PTC-1 用胰蛋白酶消化,并将浓度调整为 2×10^5 个/孔,接种于 24 孔板中进行培养。将各组细胞与培养基充分混合后加入到甲状腺乳头状癌细胞株 TPC-1,空白对照组不转染,37℃,5% CO₂ 培养箱中培养 6 h,观察到细胞融合度达到 80%时,用不含血清的 RPMI1640 培养基继续培养细胞 24 小时,更换成含 10%FBS 的 RPMI1640 培养基继续培养。

1.2.3 RT-qPCR 检测 miR221 的表达 利用 TRIzol 提取转染细胞中的总 RNA,按照逆转录试剂盒 Rever Tra Ace qPCR RT Master Mix 说明合成 cDNA,按照实时定量 PCR 试剂盒 KOD SYBR qPCR Mix 操作说明进行目的基因的扩增。以 U6 作为内参,根据 Ct 值按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法进行计算。每组设定 3 个技术重复,每个实验结果重复 3 次,最后用平均值计算。

1.2.4 MTT 法检测细胞增殖 试验分为 4 组:A:miR-221 模拟物组;B 组:miR-221 抑制物组;C:无关序列组;D:空白对照组。用 0.25%的胰蛋白酶将细胞消化成单细胞,调整细胞浓度为每毫升中含有 2×10^5 个细胞,接种于 96 孔细胞培养板中,每孔加入约 2000 个细胞。观察到细胞贴壁后,取 1d、2d、3d、4d、5d 的样品,每孔加入 20 μ L(5 mg/mL)MTT 溶液,37℃ 饱和湿度、5% CO₂ 培养箱中继续孵育 4 h 后,每孔加入 150 μ LDMSO 溶液,摇床中混合均匀后,用酶标仪在波长为 490nm 处测定各组的吸光度 OD。以时间为横坐标,OD 值为纵坐标,绘制各组细胞的生长曲线,分析转染后各组细胞的生长状况。

1.2.5 细胞划痕试验检测细胞迁移能力 试验分为 4 组:A:miR-221 模拟物组;B 组:miR-221 抑制物组;C:无关序列组;D:空白对照组。取 3 个 6 孔培养板分别标记为 A、B、C、D,把四组细胞用 0.25%的胰蛋白酶消化成单细胞悬液,使每孔含有 4×10^5 个细胞,观察到细胞铺满瓶底,用移液枪沿着直尺在培养板上划痕。PBS 洗涤细胞三次,除去划痕时划下的细胞,向每个孔中加入无血清 RPMI1640 培养基 2 mL,37℃ 饱和湿度、5% CO₂ 培养箱中孵育,分别在 0 h、24 h、48 h 取样拍照。每组设置 3 个复孔,实验重复 3 次。

1.2.6 流式细胞仪检测细胞凋亡 转染的 miR-221 模拟物组、miR-221 抑制物组和无关序列组甲状腺癌 PTC-1 细胞培养 48 小时,弃去上清液,0.25%的胰蛋白酶消化细胞,PBS 重悬细胞,调整细胞浓度为每毫升含细胞 3×10^5 个,取出细胞悬浮液 1 mL,1000 rpm,4℃ 离心 8 min,弃去上清,PBS 洗涤细胞 3 次,

向细胞中加入 200 μL Binding Buffer 重悬细胞,分别加入 5 μL PI 和 Annexin-V,充分混匀后避光静置 20 min,加 300 μL 缓冲液,流式细胞仪观察细胞凋亡情况。

1.3 统计学处理

结果用均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用 t 检验, $P<0.05$ 为统计学差异。

2 结果

2.1 miR-221 在甲状腺乳头癌细胞株的表达

从图 1 可知:甲状腺乳头癌细胞株 BCPAP、K1 和 TPC-1 的表达都显著高于甲状腺正常细胞 Nthy-ori 3-1。由于甲状腺乳头癌细胞株 TPC-1 中 miR-221 在三个细胞中高表达,因此选用甲状腺癌细胞株 TPC-1 做后续研究。

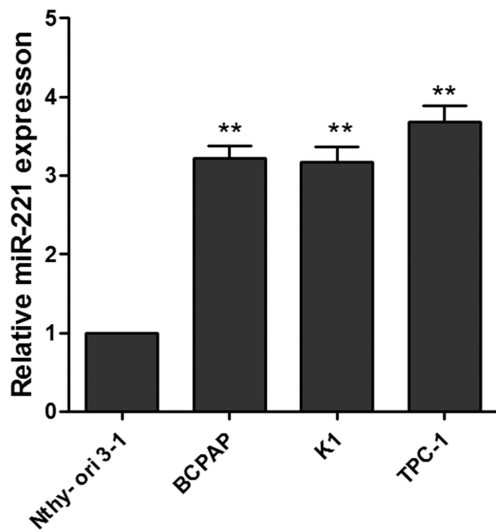


图 1 miR-221 在甲状腺乳头癌细胞株 BCPAP、K1 和 TPC-1 的表达
Fig.1 The expression level of miR-221 in papillary thyroid carcinoma cell lines BCPAP, K1, and TPC-1

Note: ** $P<0.01$ vs. Nthy-ori 3-1.

2.2 RT-qPCR 检测转染后 miR-221 的表达

图 2 显示转染 miR221 模拟物的 miR221 的表达显著高于空白对照组,转染 miR221 抑制物的 miR221 的表达显著低于空白对照组 ($P<0.001$),转染无关对照与空白对照无差异($P>0.05$)。

2.3 miR-221 对细胞增殖的影响

从图 3 可以获知,在四组细胞中,与空白对照组比较,转染 miR-221 模拟物组细胞的增殖速度最快,转染 miR-221 抑制物组细胞的增殖速度最慢,miR-221 模拟物组和 miR-221 抑制物组细胞从第三天开始与空白对照组有显著差异($P<0.01$),无关对照组与空白对照组无显著差异 ($P>0.05$)。这说明转染 miR-221 模拟物能促进细胞的增殖,转染 miR-221 抑制物能抑制细胞的增殖,转染无关对照对细胞增殖没有影响($P>0.05$)。

2.4 miR-221 对细胞迁移的影响

划痕试验检测结果如图 4 所示,转染 miR-221 模拟物组细胞的迁移数高于空白对照组,转染 miR-221 抑制物组细胞的迁移数低于空白对照组,并且都达到了统计学显著性($P<0.01$),

无关对照组与空白对照组无显著差异 ($P>0.05$)。这提示转染 miR-221 模拟物有助于细胞的迁移,转染 miR-221 抑制物降低了细胞的迁移,转染无关对照对细胞迁移无影响。

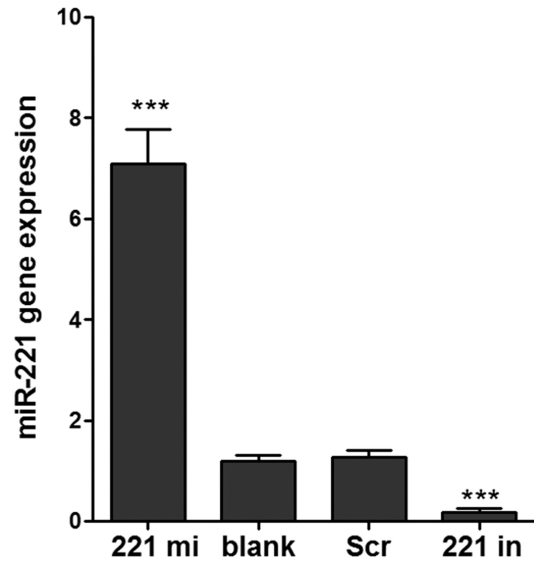


图 2 转染后 miR-221 基因的表达水平

Fig.2 The expression level of miR-221 gene after transfection

Note: 221 mi: miR-221 mimics group; 221 in: miR-221 inhibitor group; blank: blank control group; Scr: Scramble control group; *** $P<0.001$ vs. blank.

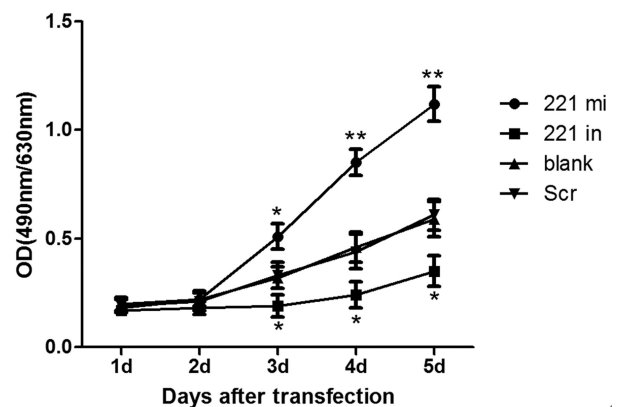


图 3 miR-221 对甲状腺癌细胞 TPC-1 增殖的影响

Fig. 3 Effects of miR-221 on the proliferation of TPC-1 papillary thyroid carcinoma cells

Note: 221 mi:miR-221 mimics group; 221 in:miR-221 inhibitor group; blank: blank control group; Scr: Scramble control group; * $P<0.05$ vs. blank, ** $P<0.01$ vs. blank.

2.5 miR-221 对细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测凋亡结果显示,转染 miR-221 模拟物组细胞凋亡率显著低于空白对照组 ($P<0.01$),转染 miR-221 抑制物组细胞凋亡率显著高于空白对照组 ($P<0.001$),转染无关对照对细胞凋亡无影响($P>0.05$)。这提示转染 miR-221 模拟物组能降低细胞的凋亡,转染 miR-221 抑制物组能增加细胞的凋亡,转染无关对照对细胞凋亡没有影响。

3 讨论

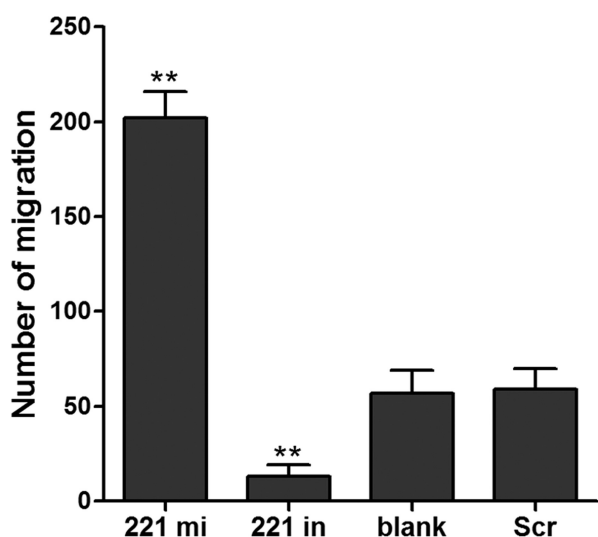


图 4 miR-221 对甲状腺乳头癌细胞 TPC-1 迁移的影响

Fig. 4 Effects of miR-221 on the migration of TPC-1 papillary thyroid carcinoma cells

Note: 221 mi:miR-221 mimics group; 221 in:miR-221 inhibitor group; blank: blank control group; Scr: Scramble control group; **P<0.01 vs. blank

甲状腺乳头癌是甲状腺癌最常见的类型,女性患者和青少年的发病率较高,在临床上主要表现为缓慢生长的肿块,目前采取的治疗方法主要是手术,但预后一般不理想^[13,14]。而且肿瘤细胞的再次增殖、转移、凋亡会给生命造成严重的威胁^[15]。近些年的研究发现,miRNA 可作为肿瘤的标志物,已成为研究热点。因此,本研究对 miR-221 在甲状腺乳头癌的生物特性进行了研究。

研究某个分子在肿瘤细胞中的作用,首先要证实这个分子在肿瘤细胞中的表达情况。研究 miRNA 的作用也是如此,首先

要证实 miRNA 在肿瘤中的表达情况^[16]。当证实某个 miRNA 在某一个肿瘤细胞株的表达与其他肿瘤有差别时,研究这个细胞才更有意义^[17]。本研究选择了三个甲状腺乳头癌细胞株 BC-PAP、K1 和 TPC-1,以正常甲状腺细胞株 Nthy-ori 3-1 作为对照,检测 miR-221 在各个细胞中的表达情况,结果发现,miR-221 在甲状腺乳头癌细胞株 TPC-1 的表达最高,因此选择甲状腺乳头癌细胞株 TPC-1 作为后续的研究。

上调或是下调 miRNA 需要构建 miRNA 模拟物和 miRNA 抑制物,将 miRNA 模拟物转染到细胞,能被加工为成熟的 miRNA,从而增加了 miRNA 的表达量,在细胞中的作用更强。将 miRNA 抑制物转染到细胞后,使 miRNA 表达量下降,抑制该 miRNA 与靶基因结合,从而使 miRNA 的功能减弱^[18]。本研究将 miR-221 模拟物和抑制物以及无关对照转染到甲状腺乳头癌细胞株 TPC-1,以空白对照作为参照,结果显示,miR-221 模拟物的表达量显著高于空白对照组,miR-221 抑制物的表达显著低于空白对照组,无关序列与空白对照无差异,这说明转染是成功的,能继续后续的试验研究。

细胞的增殖、凋亡是生命活动的基础,是生物生长、发育、繁殖的必备条件,然而,当细胞增殖失控,就会引起肿瘤的发生^[19,20]。前人的研究已经证实 miR-221 在肿瘤中高表达,我们想进一步证实 miR-221 对甲状腺乳头癌增殖、凋亡、迁移的影响。我们将构建的 miR-221 模拟物和抑制物以及无关对照转染到甲状腺乳头癌细胞株 TPC-1,以空白对照作为参照,结果显示,与空白对照组相比,转染 miR-221 模拟物组可促进甲状腺乳头癌细胞株 TPC-1 的增殖和迁移,抑制细胞的凋亡,转染 miR-221 抑制物可降低甲状腺乳头癌细胞株 TPC-1 的增殖和迁移,增加细胞的凋亡。这说明过表达 miR-221 可促进细胞增殖、迁移,抑制细胞凋亡。抑制 miR-221 表达可降低细胞增殖、迁移,增加细胞凋亡。

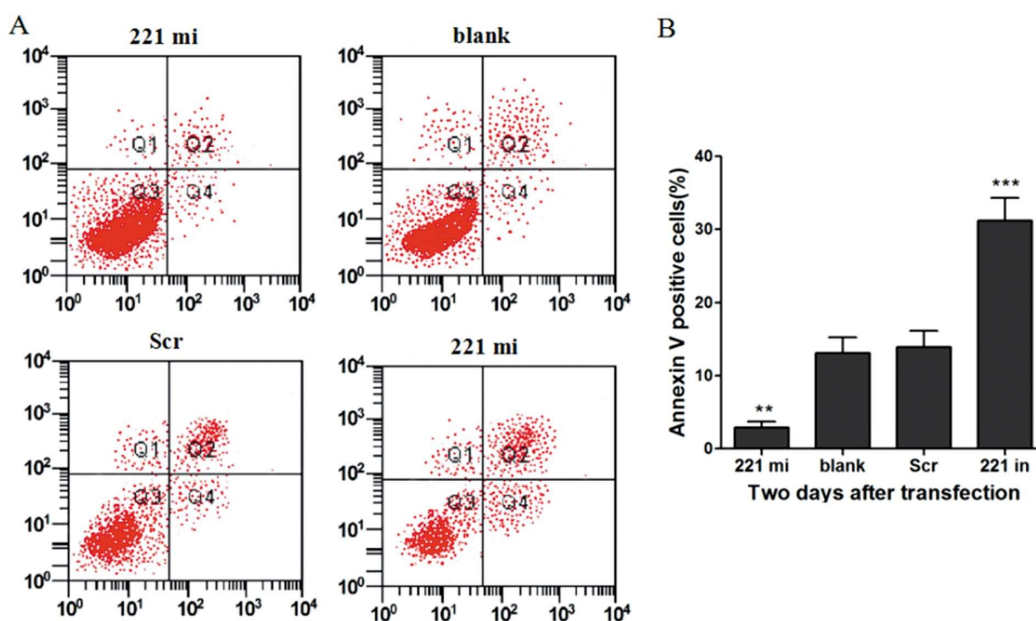


图 5 各组细胞凋亡率的变化

Fig. 5 Changes of apoptosis rate in each group

Note: A: Flow cytometry results; B: Protein expression rate; **P< 0.01 vs. blank, ***P< 0.001 vs. blank.

综上所述,过表达 miR-221 可促进细胞增殖、迁移,抑制细胞凋亡。抑制 miR-221 表达可降低细胞增殖、迁移,增加细胞凋亡。

参考文献(References)

- [1] Wang Y, Guo Q, Zhao Y, et al. BRAF activated long non coding RNA contributes to cell proliferation and activates autophagy in papillary thyroid carcinoma[J]. *Oncology letters*, 2014, 8(5): 1947-1952
- [2] Matsuzaki K, Sugino K, Masudo K, et al. Thyroid lobectomy for papillary thyroid cancer: long-term follow-up study of 1,088 cases[J]. *World journal of surgery*, 2014, 38(1): 68-79
- [3] Gandolfi G, Ragazzi M, Frasoldati A, et al. TERT promoter mutations are associated with distant metastases in papillary thyroid carcinoma [J]. *European Journal of Endocrinology*, 2015, 172(4): 403-413
- [4] Strickland K C, Howitt B E, Marqusee E, et al. The impact of noninvasive follicular variant of papillary thyroid carcinoma on rates of malignancy for fine-needle aspiration diagnostic categories [J]. *Thyroid*, 2015, 25(9): 987-992
- [5] Lauressergues D, Couzigou J M, San Clemente H, et al. Primary transcripts of microRNAs encode regulatory peptides [J]. *Nature*, 2015, 520(7545): 90-93
- [6] Schultz N A, Dehlendorff C, Jensen B V, et al. MicroRNA biomarkers in whole blood for detection of pancreatic cancer [J]. *Jama*, 2014, 311(4): 392-404
- [7] Li B S, Zuo Q F, Zhao Y L, et al. MicroRNA-25 promotes gastric cancer migration, invasion and proliferation by directly targeting transducer of ERBB2, 1 and correlates with poor survival [J]. *Oncogene*, 2015, 34(20): 2556-2565
- [8] Su Z, Yang Z, Xu Y, et al. MicroRNAs in apoptosis, autophagy and necroptosis[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(11): 8474
- [9] Yang F, Wang W, Zhou C, et al. MiR-221/222 promote human glioma cell invasion and angiogenesis by targeting TIMP2 [J]. *Tumor Biology*, 2015, 36(5): 3763-3773
- [10] Fernandez S, Risolino M, Mandia N, et al. miR-340 inhibits tumor cell proliferation and induces apoptosis by targeting multiple negative regulators of p27 in non-small cell lung cancer [J]. *Oncogene*, 2015, 34(25): 3240-3250
- [11] Aragon Han P, Weng C H, Khawaja H T, et al. MicroRNA expression and association with clinicopathologic features in papillary thyroid cancer: a systematic review[J]. *Thyroid*, 2015, 25(12): 1322-1329
- [12] Lee J C, Zhao J T, Gundara J, et al. Papillary thyroid cancer - derived exosomes contain miRNA-146b and miRNA-222 [J]. *Journal of Surgical Research*, 2015, 196(1): 39-48
- [13] Yang Chun-jiang, Tu Fei, Yu Lei-tao. Influencing factors of VI lymph metastasis in Senile cervical lymph node negative thyroid papillary carcinoma patients[J]. *The Chinese Journal of Gerontology*, 2015, 35(13): 3645-3647
- [14] Suman P, Wang C H, Abadin S H S, et al. Risk factors for central lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma: A National Cancer Data Base (NCDB) study[J]. *Surgery*, 2016, 159(1): 31-40
- [15] Oda H, Miyauchi A, Ito Y, et al. Incidences of unfavorable events in the management of low-risk papillary microcarcinoma of the thyroid by active surveillance versus immediate surgery[J]. *Thyroid*, 2016, 26(1): 150-155
- [16] Duygu B, de Windt L J, da Costa Martins P A. Targeting microRNAs in heart failure[J]. *Trends in cardiovascular medicine*, 2016, 26(2): 99-110
- [17] Huang Dong-yun, Xu Wen-jing, Zhou Rui. The expression of CD163 in non small cell lung cancer tissue and its effect on the invasion and proliferation of lung cancer cells[J]. *Chinese Journal of immunology*, 2016, 32(3): 410
- [18] Wen Yan, Xu An-jie, Jiang Ming Zhu. Effects of miR-496 on the cell cycle in hepatocellular carcinoma cell line HepG2 [J]. *Journal of Jiangsu University of Science and Technology (Natural Science Edition)*, 2016, 30(01): 99-102
- [19] Liu C, Chen Z, Fang J, et al. H19-derived miR-675 contributes to bladder cancer cell proliferation by regulating p53 activation [J]. *Tumor Biology*, 2016, 37(1): 263-270
- [20] Clavier A, Rincheval-Arnold A, Colin J, et al. Apoptosis in *Drosophila*: which role for mitochondria?[J]. *Apoptosis*, 2016, 21(3): 239-251
- [21] Ye Z, Hao R, Cai Y, et al. Knockdown of miR-221 promotes the cisplatin-inducing apoptosis by targeting the BIM-Bax/Bak axis in breast cancer[J]. *Tumor Biology*, 2016, 37(4): 4509-4515
- [22] Zhao D, Zhuang N, Ding Y, et al. miR-221 activates the NF- κ B pathway by targeting A20 [J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 2016, 472(1): 11-18